Atualização

www.eoftalmo.org.br

doi> http://doi.org/10.17545/eOftalmo/2017.100

Preservação de córneas: um breve histórico

Corneal preservation: A brief history

Preservación de córneas: un breve historial

Sidney Julio Faria e Sousa. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. sidneyjfs@gmail.com
Stella Barretto. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. stellabfs@gmail.com

RESUMO

O primeiro transplante de córnea bem sucedido utilizou tecido de um doador vivo. A preservação das córneas somente ganhou impulso após Filatov ter demonstrado que o olho de cadáver, quando armazenado a baixa temperatura, poderia ser uma fonte de córneas viáveis para transplantes. Três métodos revelaram-se úteis para este fim: câmera úmida, criopreservação e armazenamento em meio líquido Estes métodos emergiram nesta ordem apresentada. O primeiro, fornece armazenamento frio de córneas *in situ* por até dois dias após a morte, sendo este método ainda útil nas regiões pobres do nosso planeta. Os bancos de olhos praticamente abandonaram o segundo método devido à sua complexidade. Atualmente, a técnica de armazenamento mais popular é a terceira. Dependendo da composição do meio líquido, é possível preservar a córnea a frio ou à temperatura ambiente *ex situ*. Este artigo descreve as características dos três sistemas de armazenamento em uma sequência quase cronológica.

ABSTRACT

The first successful corneal transplantation used tissue from a living donor. The preservation of corneas gained momentum only after Filatov showed that a cadaver´s eye, when stored at low temperature, could be a source of viable corneas for transplants. Three methods proved to be useful for this purpose: moist chamber, cryopreservation, and liquid medium storage. They were introduced in that order. The first provides cold storage of corneas *in situ* for up to 2 days after death. It is still useful in underdeveloped regions of our planet. Eye banks practically abandoned the second method due to its complexity. Currently, the most popular storage technique is the third. Depending on the composition of the liquid medium, it allows for cold or warm preservation of the cornea *ex situ*. This article describes the characteristics of the three storage systems in quasi-chronological sequence.

RESUMEN

El primer trasplante de córnea exitoso utilizó tejido de un donador vivo. La preservación de las córneas solamente ganó empuje después de que Filatov demostró que el ojo de cadáver, cuando se almacena a baja temperatura, podría ser una fuente de córneas viables para trasplantes. Tres métodos demostraron ser útiles para este fin: cámara húmeda, criopreservación y almacenaje en medio líquido. Estos métodos emergieron en ese orden presentado. El primero provee almacenaje frío de córneas *in situ* por hasta dos días después de la muerte, siendo este método aún útil en las regiones pobres de nuestro planeta. Los bancos de ojos prácticamente abandonaron el segundo método debido a su complejidad. Actualmente, la técnica de almacenaje más popular es la tercera. Dependiendo de la composición del medio líquido, es posible preservar la córnea a frío o a temperatura ambiente *ex situ*. Este artículo describe las características de los tres sistemas de almacenaje en una secuencia casi cronológica.

Palavras-Chave:
Transplante de córnea;
Bancos de olhos;
Preservação de tecido.

Keywords:
Corneal transplantation;
Eye banks;
Tissue preservation.

Palabras Clave:
Trasplante de córnea;
Bancos de ojos;
Conservación de tejido.

Fonte de financiamento: declaram não haver.
Parecer CEP: não se aplica.
Conflito de interesses: declaram não haver.
Recebido em: 03/04/2017
Aprovado em: 08/08/2017
Publicado em: 20/09/2017

Como citar: Sousa SJF, Barretto S. Preservação de córneas: um breve histórico. eOftalmo. 2017; 3(3): 23-30
http://doi.org/10.17545/eoftalmo/2017.100

INTRODUÇÃO

O choque de tropas francesas e inglesas no Egito, entre 1798 e 1801, como parte das guerras napoleônicas, causou o contato de um número significativo de soldados europeus com tracoma. [1] O retorno dos combatentes à terra de origem gerou epidemias de tracomas em Londres, Paris e Bruxelas, em 1801, 1806 e 1815, respectivamente. [2] O transplante de córnea surgiu como intenção de tratar a opacidade corneana resultante dessas epidemias. Em 1824, Franz Reisinger [3] apresentou o transplante corneano penetrante, o qual ele chamou de ceratoplastia. A proposta derivou-se de um estudo experimental em coelhos. Reisinger não realizou cirurgia em seres humanos, mas sugeriu que as córneas pudessem ser de animais. Inúmeras tentativas mal sucedidas para realizar transplantes de córnea, tanto penetrantes quanto lamelares, caracterizaram os esforços neste campo no século XIX. Durante este período, os olhos de animais eram a principal fonte de enxertia devido à sua fácil disponibilidade, e desconhecimento sobre a intolerância imunológica. [4] Powers, em 1873, foi o primeiro a recomendar o uso de aloenxertos ao invés de xenoenxertos, pela semelhança de textura e espessura entre o doador e a córnea receptora [5]. Em 1905, Zirm [6] realizou o primeiro transplante bem sucedido em humanos, com córnea colhida de um doador vivo. O fato revelou a teoria de Fuchs de que a opacidade de enxerto generalizada era uma parte inerente do processo de cicatrização da córnea transplantada. [7] A partir desta data, os cirurgiões começaram a usar tecido de doadores vivos, cujos olhos sofreram trauma severo sem envolvimento da córnea. Uma possível motivação para a excisão desses olhos foi o receio de uveíte simpática.

Preservação a frio da córnea - *in situ*

Em 1935, Filatov [8] publicou sua observação de que os olhos mantidos a 4°C em frascos de vidro hermeticamente fechados podiam manter a córnea viável para transplantes por até 56 horas após a morte. Esta observação continha dois conceitos revolucionários:de que as córneas poderiam sobreviver à morte do doador temporariamente e que a hipotermia poderia prolongar o período de vitalidade de suas células. Supondo que os globos oculares pudessem estar contaminados, ele também aconselhou banhos com solução verde brilhante 1:2000. Ao longo do tempo, os frascos utilizados ganharam um revestimento de gaze ou algodão embebido em solução salina, criando uma câmara úmida quando selada. Neste meio, a córnea é armazenada *in situ* a 4°C. No momento da cirurgia, a córnea é retirada do olho por trepanação através do lado epitelial. Este método de armazenamento deu origem ao banco de olhos *stricto sensu*, representado por uma geladeira que armazena os olhos em câmaras úmidas. Em 1944, Paton e Aida Breckinridge [9] criaram o banco de olhos *lato sensu* - uma instituição para colher, armazenar, analisar e distribuir córneas para transplante. À medida que a experiência com o enxerto corneano melhorou, ficou claro que o intervalo seguro de preservação na câmara úmida era de até 48 horas após a morte. Esta restrição de tempo começou a ser desafiada em 1954, quando Stoker [10] demonstrou de forma convincente que o endotélio é responsável pela manutenção da transparência da córnea trocando ativamente eletrólitos entre o estroma e a câmara anterior. Este fato teve um papel decisivo na percepção de que o endotélio era o principal objeto de preocupação no esforço para prolongar o período da vitalidade corneana após a morte.

Em 1968, Mizukawa e Manabe [11,12] descreveram um meio líquido para armazenamento corneano *in situ* a 4°C contendo meio de cultura de tecidos 199, sulfato de condroitina, precursores de ATP, penicilina e estreptomicina. Ao trocar o meio em dias alternados, a preservação da córnea foi efetiva até quatro dias. Embora este método tenha tido pouca repercussão fora do Japão, ele ganhou lugar na história como o primeiro meio líquido a preservar a córnea à baixa temperatura, utilizando um meio de cultura celular enriquecido com sulfato de condroitina, estimulantes do metabolismo celular e antibióticos.

Preservação a frio da córnea – *ex situ*

Em 1974, McCarey-Kaufman (M-K) apresentou um meio de armazenamento líquido a ser mantido a 4°C, capaz de manter a vitalidade endotelial por até 4 dias. [13,14] Ao contrário do método japonês, a córnea foi preservada fora do globo ocular delimitada por uma borda escleral. A vantagem deste sistema foi a simplicidade e baixo custo. As soluções de armazenamento foram comercializadas em frascos transparentes, permitindo inspeção endotelial na lâmpada de fenda e contagem de células via microscopia especular. Veja a Figura 1. A formulação original consistiu em uma mistura de meio de cultura de tecidos 199, tampão de bicarbonato, dextrano e antibióticos. Posteriormente, o indicador HEPES e vermelho fenol substituiram o tampão de bicarbonato para estabilizar e monitorar o pH. [15]
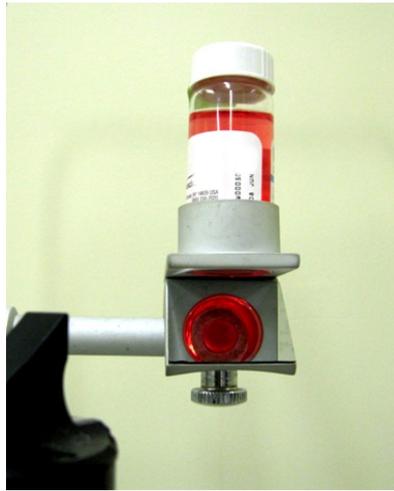
Figura 1. Inspeção de córnea na lâmpada de fenda

Embora o meio M-K tenha estendido o tempo de preservação por apenas dois dias em relação à câmara úmida, ele também ofereceu flexibilidade suficiente para se converter a ceratoplastia em um procedimento eletivo. Com esta melhora, os transplantes de córnea tiveram um impulso significativo. A trepanação do enxerto do lado endotelial também ganhou popularidade, estimulando modificações engenhosas nos instrumentos de corte da córnea. Os cirurgiões já conheciam os botões corneoescleral desde 1965, em associação com a criopreservação da córnea [16]. No entanto, apenas um grupo restrito dentre eles teve acesso a este método laborioso de armazenamento corneano.

Como um todo, os meios de armazenamento de líquidos para preservação a frio contém os seguintes componentes: (1) meio de cultura de células; (2) solução tampão; (3) agente hiperosmótico; (4) indicador de pH; (5) antibióticos e (6) aditivos.

As soluções de cultura de células são soluções salinas balanceadas com nutrientes celulares, aminoácidos, vitaminas, carboidratos e cofactores que mantém a vitalidade das células, tecidos e órgãos em um ambiente artificial. [17] Os mais utilizados são TC-199, MEM ou a combinação de ambos com a solução de Earle. Os tampões são soluções aquosas de ácidos fracos com suas bases conjugadas que mantém o pH em torno de 7.4. O tampão de bicarbonato e o HEPES são os mais populares do banco dos olhos. Os agentes hiperosmóticos reduzem o edema corneano associado à preservação do meio líquido. [12] Este fenômeno é uma conseqüência direta da depressão após a morte generalizada da atividade metabólica das células da córnea, particularmente aquelas da camada endotelial. Os agentes hiperosmóticos utilizados na preservação a frio são o dextrano e o sulfato de condroitina. O primeiro é mais eficiente do que o posterior, apesar de ser mais tóxico para o endotélio, particularmente em concentrações iguais ou superiores a 5%. [12] O sulfato de condroitina tem o efeito adicional de proteger as células endoteliais, quando utilizado em baixa temperatura e na concentração certa. [12,18] Os meios de armazenamento modernos utilizam associações de ambos os agentes em concentrações menores do que o uso individual para promover a desidratação satisfatória e segura para o endotélio. [19] O indicador de pH prevalecente é o vermelho fenol, o que dá ao meio uma coloração rosada com pH 7,4. Acima deste valor, torna-se vermelha e abaixo, amarela. A cor amarela sugere contaminação microbiana do meio. O antibiótico é a defesa final contra a colonização bacteriana no botão corneoescleral. A primeira combinação de antibióticos empregados foi a penicilina com estreptomicina. [11,13] A mídia atual usa gentamicina com estreptomicina. [19] A dose usual destes antibióticos está na gama de 80-100 µg/mL. Os aditivos são substâncias introduzidas no meio líquido para contrabalançar os efeitos deletérios da temperatura fria e do tempo de preservação no endotélio. Eles incluem antioxidantes, como glutationa; estabilizadores de colagénio, tais como L-hidroxiprolina; precursores de ATP, como adenina, adenosina e inosina; fontes de energia, como o piruvato de sódio; vitaminas como ácido ascórbico, calciferol, niacina; e micronutrientes. [19] A formulação desses elementos é geralmente protegida por segredos industriais.

Em 1984, Kaufman e associados [20] introduziram o meio K-Sol (Cilco, Huntington, West Virginia) cuja novidade foi a substituição de 5% de dextrano por 2,5% de sulfato de condroitina. O último agente foi crítico para prolongar o período de preservação de tecido por uma semana, apesar de uma expectativa inicial duas vezes maior. O problema com esta substituição foi que o sulfato de condroitina,

por si só, não possuía suficiente força osmótica para evitar o edema corneano induzido pela preservação. [12] Na tentativa de resolver este impasse, foram testadas várias combinações dos principais constituintes dos meios de armazenamento, dando origem a novas formulações comerciais. Entre eles, Dexsol e Optisol GS (Chiron Ophthalmics, Irvine, Califórnia) que se destacam por seu uso generalizado. Ambos preservam as córneas por até 14 dias a 4°C, embora o último seja superior quanto à preservação da morfologia celular e manutenção da espessura original da córnea. [19,21] As formulações básicas dos meios MK, Dexsol e Optisol GS estão demonstradas na Tabela 1 abaixo. O meio intermediário mais recente para preservação da córnea a 4°C, aprovado pelo FDA em 2007, é Life4C (Numedis Inc, Isanti, Minnesota). Embora, contenha suplementos como insulina humana recombinante, glutationa e outros, seu desempenho parece ser semelhante ao do Optisol GS. [22]

Tabela 1. Composição de três meios de preservação a frio.

Componentes	McCarey-Kaufman	Dexsol	Optisol GS
Meio de Cultura	TC-199	MEM	TC199 MEM Solução de Earle
Solução Tampão	HEPES	HEPES	HEPES
Dextrano (%)	5.00	1.00	1.00
Sulfato de condroitina (%)	-	1.35	2.50
Piruvato de sódio (mM)	-	1.00	1.00
Aminoácidos não-essenciais (mM)	-	0.10	0.10
Antibiótico	Penicilina Streptomicina	Gentamicina	Gentamicina Streptomicina
Precursores de ATP	-	-	+
L-hidroxiprolina	-	-	+
Colesterol	-	-	+
Vitaminas	-	-	+

MEM: Meio Essencial Mínimo; TC-199: Meio de Cultura de Tecidos 199;

HEPES: 2-[4-(2-Hidroxietil) piperazina-1yl] ácido etano-sulfônico;

+: presença; -: ausência

Preservação à temperatura ambiente da córnea – *ex situ*

A preservação à temperatura ambiente da córnea é mais conhecida como armazenamento de cultura de órgãos, estabelecida por Doughman em 1976. [23] Neste procedimento, o botão corneocleral é armazenado em meio líquido durante quatro semanas, com temperaturas variando de 31°C a 37°C, de acordo com o método de preferência. [24] Outra diferença entre os métodos é a renovação da solução durante o período de armazenamento. Alguns bancos de olhos não mudam, e outros o renovam a cada 1 ou 2 semanas. [25,26]

À temperatura ambiente, as células endoteliais tendem a consumir os agentes hiperosmóticos que eventualmente se tornam tóxicos para elas. [27] Como conseqüência, esses agentes não são utilizados periodicamente na preservação da cultura de órgãos. O problema com a sua ausência é que as córneas preservadas adquirem duas vezes a espessura normal. Para contrabalançar este evento, tornando as córneas finas e transparentes, é necessário mergulhar o botão corneocleral em um meio de transporte suplementado com dextrano, em concentrações variando de 4-8%, imediatamente antes de enviá-lo para o cirurgião. [25,28] O período máximo de imersão em tecidos varia de menos de um dia a sete dias, a critério do banco de olhos. [28] O inchaço dos tecidos associados aos meios de armazenamento de órgãos não permite análises de lâmpadas de fenda ou microscopia especular do endotélio. A identificação das células endoteliais requer a dilatação dos espaços intercelulares, que é feita mergulhando a córnea em uma solução de NaCl a 0,4%, sendo a observação do mosaico endotelial feita por microscopia óptica com objetivos de longo alcance. [29] A interpretação dos resultados exige muita experiência, uma vez que a configuração do endotélio varia com a composição do meio e o período de armazenamento. [30] Para testar

a esterilidade, uma amostra é cultivada no sétimo dia de preservação e outra imediatamente antes de liberar a córnea para o transplante.[31]

A principal vantagem do uso à temperatura ambiente comparado à preservação a frio, é o periodo da conservação do tecido, que é duas vezes maior do que o melhor meio de preservação a frio. O período prolongado de armazenamento não só aumenta o tempo de análise de tecidos, mas também atenua a flutuação da acessibilidade da córnea. Outras vantagens alegadas deste sistema incluem um melhor monitoramento da esterilidade do meio, uma vez que a contaminação torna-se rapidamente evidente em temperaturas quentes; [28] a retenção da capacidade de cicatrização *in vitro* da camada endotelial por hipertrofia celular e deslizamento; [32] e a possibilidade de revigorar o endotélio da córnea transferindo a córnea de um meio hipotérmico para um armazenamento de cultura de órgãos. [33] No entanto, a importância prática desses atributos na sobrevivência do enxerto ainda precisa de uma demonstração convincente. Em contrapartida, a preservação da cultura de órgãos consome mais tempo e é mais trabalhosa do que o armazenamento a frio. A necessidade de verificar a esterilidade do meio, a técnica invasiva para análise endotelial e a dependência de um meio de transporte impedem o uso imediato da córnea. O custo total do método tende a ser maior devido à necessidade de manter um laboratório mais sofisticado com pessoal altamente especializado. Embora a composição dos meios de cultura de órgãos varie com as preferências de cada banco de olho, a maioria contém os mesmos ingredientes essenciais. A Tabela 2 mostra um exemplo de formulação, apenas para uma comparação com meios de preservação a frio. [29]

Tabela 2. Meio de preservação à temperatura ambiente

Componentes	Ingredientes	Quantidade
Meio de Cultura	MEM + Solução de Earle	50 ml
Solução Tampão	HEPES	25 mM/mL
Agentes alcalinizantes	N_aHCO_3	2.20 mg/mL
Nutrientes	Soro Fetal Bovino	2 %
Antibiótico	Amicacina	0.10 mg/mL
	Carbenicilina	0.50 mg/mL
Antifúngico	Nistatina	50 UI/mL
Indicator de pH	Vermelho Fenol	0.77g/L
Temperatura		31°C
pH		7.4

Criopreservação

Em 1965, Chapel-Kaufman-Robins [16] lançou o primeiro método prático e confiável de criopreservação da córnea. Este processo requer a imersão do botão corneoescleral durante 10 minutos em quatro soluções de 1 mL de albumina de soro humano, com concentrações crescentes de sulfóxido de dimetilo e sacarose. O frasco contendo o último banho é selado e refrigerado de maneira controlada para -80°C e, depois, transferido para um tanque de nitrogênio líquido a -160°C. No momento da cirurgia, alguém da equipe reaquece o frasco em água a 56°C até formar uma bola de gelo no centro do tecido. Em seguida, a córnea é retirada do frasco e

colocada em 1mL de solução de albumina humana a 4°C durante 10 minutos, pelo menos, e mantida a essa temperatura até o momento da sua utilização.

A vantagem da criopreservação é manter o tecido vivo indefinidamente. A desvantagem é que o processo é trabalhoso, exigindo logística sofisticada e pessoal altamente qualificado. Os doadores devem ter menos de 50 anos de idade e as córneas preservadas dentro de algumas horas após a morte. [34,35] Por causa dessas limitações, o método não se tornou popular. No entanto, alguns bancos de olhos, como o Indianapolis Lions Eye Bank, o utilizaram com sucesso até o final da década de 1980, quando o meio de armazenamento de médio prazo tornou-se de uso generalizado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, o sistema dominante de preservação da córnea é o armazenamento corneano *ex situ* em meio líquido, sob temperatura fria ou ambiente. Cada uma dessas duas modalidades oferece várias opções. Três questões são relevantes na escolha do meio: disponibilidade local, custo e período de armazenamento. O último recurso é o mais desafiador, dada a dificuldade de verificar a informação anunciada pelos fabricantes. Parte do problema é a ausência de um método objetivo para verificar a função do endotélio. O tempo máximo de preservação, por exemplo, não se infere diretamente da atividade da camada endotelial, mas de suas características morfológicas e histoquímicas *in vitro*, bem como do destino dos enxertos a longo prazo. Esse tipo de informação está longe de ser ideal, sofrendo influências de uma grande variedade de fatores como idade do doador, tempo e causa da morte, etc. Assim, todos os métodos de armazenamento da córnea mostraram, com o tempo, um menor período de proteção do que o esperado inicialmente. Por isso, a Associação Européia de Banco de Olhos sugere antecipar o uso do tecido conservado a frio bem antes do tempo máximo de preservação fornecido pelo fabricante. No caso do Optisol, o período de armazenamento pode variar entre 7 a 10 dias. [28] No entanto, a validade desta precaução ainda requer confirmação.

REFERÊNCIAS

1. ↲ Meyerhof M. A short history of Ophthalmia during the Egyptian campaigns of 1798-1807. Br J Ophthalmol. 1932;16(3):129-152. https://doi.org/10.1136/bjo.16.3.129

2. ↲ Schlosser K. History of trachoma. Disponível em: https://www.nps.gov/elis/learn/education/upload/Trachoma-Through-History-2.pdf

3. ↲ Reisinger F. Die keratoplastik ein Versuch zur Erweiterung der Augenheilkunst. Bayerische Annalen.1824;1:207-215

4. ↲ Paton RT. History of corneal grafting. In: Keratoplasty. New York: McGraw-Hill Book Co., Inc. 1955, p.10

5. ↲ Power H: On transplantation of the cornea. Fourth International Congress Ophthalmol. London, 1872;4:172-176

6. ↲ Armitage WJ, Tullo AB, Larkin DFP. The first successful full-thickness corneal transplant: a commentary on Eduard Zirm's landmark paper of 1906. Br J Ophthalmol. 2006 Oct; 90(10): 1222–1223. https://doi.org/10.1136/bjo.2006.101527

7. ↲ Fuchs E: Ueber Keratoplastik. Wien Klin Wochenschrift 1894;7:843-845

8. ↲ Filatov VP. Transplantation of the cornea. Arch Ophthamol.1935;13(3):321-347. https://doi.org/10.1001/archopht.1935.00840030011001

9. ↲ The eye-bank for sight restoration, Inc. : Mission&History http://www.eyedonation.org/mission-and-history.html

10. ↲ Stocker FW. The endothelium of the cornea and its clinical implications. Trans Am Ophthalmol Soc. 1953; 51;669-786. PMid:13216798 PMCid:PMC1312580

11. ↲ ↲ Mizukava T, Manabe R. Recent advances in keratoplasty with special reference to the advantage of liquid preservation. Nihon Ganga Kiyo 1968; 19 (12):1310-1318

12. ↲ ↲ ↲ ↲ ↲ Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. Tr Am Ophthalmol Soc 1990;88:555-648. PMid:1710084 PMCid:PMC1298601

13. ↲ ↲ McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1974; 13(3):165-173. https://doi.org/10.1016/0002-9394(75)90273-1

14. ↲ Aquavella JV, Van Horn DL, Haggerty CJ. Corneal preservation using M-K medium. Am J Opththalmol. 1975; 80(5):791-799. https://doi.org/10.1016/0002-9394(75)90273-1

15. ↲ Waltman SR, Palmberg PF. Human penetrating keratoplasty using modified M-K medium. Ophthalmic Surg 1978;9(2);48-50. https://doi.org/10.1001/archopht.1965.00970040671015

16. ↲ ↲ Capella JA, Kaufman HE, Robbins JE. Preservation of viable corneal tissue. Arch Ophthalmol. 1965; 74(5):669-673. https://doi.org/10.1001/archopht.1965.00970040671015

17. ↲ Arora M. Cell culture media: A review. Labone (The world of laboratories) https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175

18. ↲ Yau C, Kaufman HE. A medium-term cornel preserving medium (K-Sol). Arch Ophthalmol 1986; 104(4);598-601. https://doi.org/10.1001/archopht.1986.01050160154032

19. ↲ ↲ ↲ ↲ Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA et al. Optisol corneal storage medium. Am J Ophthalmol. 1992;114(3):345-356. https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)71803-3

20. ↲ Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S. Chondroitin sulfate in a new cornea preservation medium. Am J Ophthalmol. 1984; 98(1):112-14. https://doi.org/10.1016/0002-9394(84)90198-3

21. ↲ Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol storage medium. Arch Ophthalmol. 1991;109(6):864-868. https://doi.org/10.1001/archopht.1991.01080060128040

22. ↲ Pham C, Erik Hellier E, Vo M et al. Endothelial specular image quality in Optisol GS and Life4˚C. Int J Eye Banking2013;1(2): 1-8. https://doi.org/10.7706/ijeb.v1i2.52

23. ↲ Doughman DJ, Harris JE, Schmitt KM. Penetrating keratoplasty using 37° C organ cultured cornea. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol. 1976;88:778–793. https://doi.org/10.1007/BF00154722

24. ↲ Pels E, Schuchard Y. Organ-culture preservation of human corneas. Doc Ophthalmol. 1983;56:147–153. https://doi.org/10.1007/BF00154722

25. ↲ ↲ Van Horn DLV, Schultz RO. Corneal preservation: Recent advances. Survey of Ophthalmol 1977;21(4):301:312

26. ↲ Lindstrom RL, Doughman DJ, Skelnik DL, Mindrup EA. Minnesota system corneal preservation. Br J Ophthalmol 1986;70(1);47-54. https://doi.org/10.1136/bjo.70.1.47

27. ↲ Pels E, Schuchard Y. The effects of high molecular weight dextran on the preservation of human corneas. Cornea. 1984/1985;3(3):219-227. https://doi.org/10.1007/s10792-007-9086-1

28. ↲ ↲ ↲ ↲ Pels E, Hilde B, Ilse C. Eye bank issues: II. preservation technique: warm versus cold storage. Int Ophthalmol. 2008;28(3):155-163. https://doi.org/10.1007/s10792-007-9086-1

29. ↲ ↲ Sperling S. Evaluation of the endothelium of human donor corneas by induced dilation of intercellular spaces and trypan blue. Greafes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1986; 224(6):428–434. https://doi.org/10.1007/BF02173358

30. ↲ Thuret G, Manisolle C, Herrag S et al. Controlled study of the influence of storage medium type on endothelial assessment during corneal organ culture. Br J Ophthalmol 2004;88(4):579–581. https://doi.org/10.1136/bjo.2003.022020

31. ↲ Armitage WJ. Preservation of the cornea. Transfus Med Hemother 2011;38(2):143:147

32. ↲ Doughman DJ, Van Horn DL, Rodman W, Byrnes P, Lindstrom RL. Human corneal endothelial layer repair during organ culture. Arch Opthalmol. 1976;94(10):1791-1796. https://doi.org/10.1001/archopht.1976.03910040565016

33. ↲ Camposampiero D, Tiso R, Zanetti E, Ruzza A, Bruni A, Ponzin D. Improvement of human corneal endothelium in culture after prolonged hypothermic storage. Eur. J. Ophthalmol. 2003;13(9/10):745-751. PMid:14700093

34. ↲ Waller W, Van Horn DL: Electron microscopic study of the endothelium of stored and cryopreserved monkey corneas. Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol 1973;187:79-88. https://doi.org/10.1007/BF00444148

35. ↲ Van Horn DL, Schultz RO: Endothelial survival in cryopreserved human corneas: A scanning electron microscope study. Invest Ophthalmol Vis Sci.1974;13(1):7-16

Sidney Julio Faria e Sousa

http://orcid.org/0000-0003-3021-8476

http://lattes.cnpq.br/5383266787411605

Stella Barretto

http://orcid.org/0000-0003-2175-7355